

基于镍纳米团簇-铕混合物的纸基比率荧光传感器检测四环素——推荐一个研究型综合化学实验

王宇琳, 陈锦婷, 韩炜田, 丘秀珍*

韶关学院化学与土木工程学院, 广东 韶关 512005

摘要: 介绍了一个科研转化的综合化学实验项目, 基于镍纳米团簇(NiNCs)-铕混合物(NiNCs-Eu³⁺)荧光传感器检测四环素。实验包括NiNCs-Eu³⁺的制备、表征及对四环素的响应性能, 纸基传感器的构建及可视化识别的分析方法探究。该实验综合性强、操作简便、成本低, 有利于培养学生的实验技能和科研探究能力, 让学生体验到一个“看得见”的综合化学实验。

关键词: 镍纳米团簇; 四环素; 纸基荧光传感器; 综合化学实验

中图分类号: G64; O6

Ratiometric Paper-based Fluorescent Sensor Based on Nickel Nanocluster-Europium Mixture for Detection of Tetracyclines: A Research-Oriented Comprehensive Chemistry Experiment

Yulin Wang, Jinting Chen, Weitian Han, Xiuzhen Qiu *

School of Chemistry and Civil Engineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong Province, China.

Abstract: This study presents a research-oriented comprehensive chemistry experiment project. Specifically, a fluorometric sensor based on a nickel nanocluster (NiNC)-europium complex (denoted as NiNCs-Eu³⁺) was developed for the detection of tetracyclines (TCs). This experiment includes the preparation and characterization of NiNCs-Eu³⁺, performance analysis of the response to TCs, construction of the paper-based sensor, and investigation of its visual identification. Overall, this “visible” integrated chemistry experiment is expected to promote the development of comprehensive experimental skills and research capabilities of students because it involves a strongly comprehensive process and simple operation and exhibits high feasibility.

Key Words: Nickel nanoclusters (NiNCs); Tetracyclines (TCs); Paper-based fluorescent probe; Comprehensive chemical experiment

近年来, 由于金属纳米团簇(MNCs)具有诱人的特性(如优越的光稳定性、低生物毒性和简单的合成程序)而受到广泛关注^[1-3]。镍和金银相比, 价格便宜, 资源丰富, 是合成金属簇的良好材料。另一方面, 镧系元素的铕离子(Eu³⁺)具有未被完全充满的4f电子层结构, 易与氧、氮原子配位形成具有独特荧光性能(明亮的可见光发射)的配位化合物, 作为一种新兴比率型荧光传感器被广泛应用^[4,5]。如铕离子(Eu³⁺)与四环素类药物(tetracyclines, TCs)配位结合后, 在620 nm处发出明亮的红光^[6,7]。

收稿: 2023-01-26; 录用: 2023-02-21; 网络发表: 2023-03-07

*通讯作者, Email: gold0226@126.com

基金资助: 2021年广东省高等教育教学研究和改革项目([2021] 514); 韶关学院校级自然科学类科研项目(SY2021KJ10); 2022年韶关市科技计划项目(220606144533513); 2023年广东省科技创新战略专项资金(pdjh2023b0478); 2022年大学生创新创业训练计划项目(S202210576054)

因此, 本实验设计开发了一种基于镍纳米团簇-铕混合的纸基比率荧光传感器用于四环素检测。该荧光传感器在430 nm和620 nm处荧光强度比值与分析物的浓度成线性关系, 且制备的纸基比率荧光传感器^[8]可通过颜色变化可视化识别环境水体中的TCs。通过该实验项目, 学生不仅能够掌握紫外-可见分光光度计和分子荧光光谱仪的使用方法和原理, 而且还可学到分析和处理复杂数据的能力。同时, 学生通过试纸颜色变化识别TCs含量, 能够让学生体验到一个“看得见”的综合化学实验^[9,10]。

1 实验目的

- (1) 掌握该比率荧光传感器的设计思路、合成方法、分析检测原理。
- (2) 了解紫外-可见分光光度计和分子荧光光谱仪的结构和原理, 掌握仪器的基本操作。
- (3) 学会运用各种软件对实验数据进行分析与处理。

2 实验原理

本实验设计原理如图1所示。首先合成的NiNCs在430 nm处发蓝色荧光, 加入 Eu^{3+} 溶液后, 由于诱导聚集效应, NiNCs发光强度减弱。然后, 将TCs加入到NiNCs- Eu^{3+} 混合溶液后, 由于内部过滤效应(IFE), 430 nm处的蓝色荧光淬灭, TCs通过“天线效应”将所吸收的能量有效地传递给 Eu^{3+} , 形成发红色荧光的Eu-TCs配合物, 在620 nm处出现明显荧光特征峰。随着TCs溶液浓度增加, 430 nm处的荧光强度逐渐降低, 620 nm处的荧光强度逐渐增大, 且 $I_{620 \text{ nm}}/I_{430 \text{ nm}}$ 值与待测目标物TCs浓度呈线性关系, 可用于水体中TCs的含量检测。

另外, 将浸泡有NiNCs- Eu^{3+} 的滤纸构建成为便携式纸基荧光传感器, 对于不同浓度的四环素(TC)和土霉素(OTC), 纸基传感器的独特荧光颜色从亮蓝色到红色, 可用于水体中TCs的可视化识别。

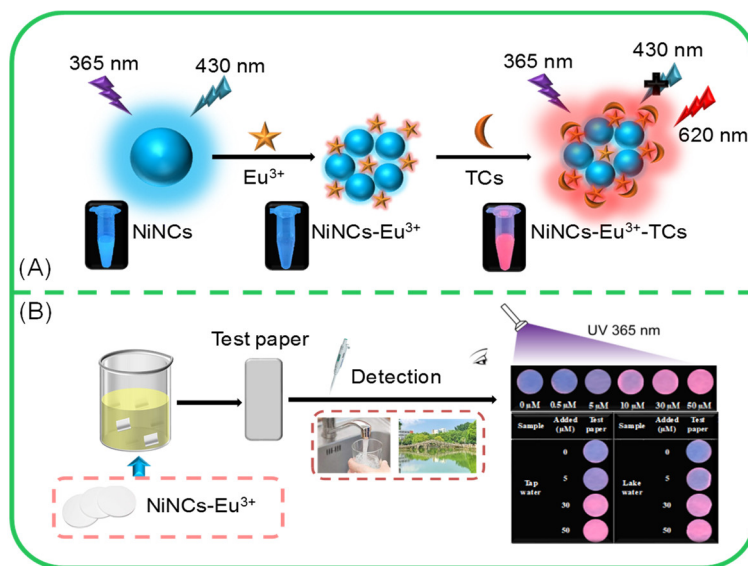


图1 纸基荧光传感器的设计 and 应用原理

电子版为彩图

3 试剂与仪器

聚乙烯吡咯烷酮(高级纯, PVP)、L-抗坏血酸(99%, L-AA)、醋酸铕(99.9%, $\text{Eu}(\text{OOCCH}_3)_3$)、土霉素(99.99%, OTC)、盐酸四环素(99.99%, TC)、金霉素(99.99%, CTC)、谷胱甘肽(98%, GSH)、L-谷氨酸(99%, L-Glu)、L-组氨酸(99%, L-His)和D-色氨酸(99%, D-Try)购置于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NaOH 、 HCl 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 ZnCl_2 、 AlCl_3 、 MgCl_2 和 CuCl_2 均为分析纯, 购置于国药集团化学试剂有限公司。滤纸购置于Whatman公司。

分子荧光光谱仪(F-380, 天津港东科技股份有限公司), 紫外-可见分光光度计(UV-650, 上海美谱达仪器有限公司), 便携式紫外箱, 涡旋振荡器(Vortex2, 德国IKA), 磁力搅拌器。

4 实验步骤

4.1 NiNCs的合成

首先, 将1 g PVP超声溶解在15 mL超纯水后, 滴加NaOH溶液($1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)将溶液的pH调节为 ~ 10.0 。接着, 向上述混合溶液中加入L-AA (2 mL, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mL, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)并在 25°C 搅拌6天。当溶液的颜色由无色变成浅黄色后, 表明NiNCs的形成。将获得的NiNCs储存在 4°C 以供进一步使用。

4.2 比率荧光传感器检测TC和OTC

向NiNCs (50 μL)和 Eu^{3+} (100 μL , $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)混合溶液中加入500 μL 不同浓度的TC和OTC溶液(0.00、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00、30.00、40.00和50.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。待振荡反应10 min后, 在激发波长为365 nm下记录荧光发射光谱。研究荧光强度比($I_{620 \text{ nm}}/I_{430 \text{ nm}}$)与不同浓度的TC和OTC之间的关系。

4.3 纸基荧光传感器的制备

用滤纸剪成直径为1 cm的试纸, 将试纸充分浸入NiNCs (50 μL)和 Eu^{3+} (100 μL , $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的混合溶液10 min, 然后在空气中干燥。移取500 μL 不同浓度的TC和OTC溶液(0.00、0.50、5.00、10.00、30.00、50.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)滴加到浸泡有NiNCs- Eu^{3+} 的试纸上, 在365 nm紫外光下观察试纸颜色变化构建纸基荧光标准比色卡。

4.4 纸基荧光传感器识别环境水样品中TCs

取环境水样(校园湖水和自来水), 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 分别加入不同浓度的TC和OTC (5.00、30.00、50.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将500 μL 加标样品溶液滴到浸泡有NiNCs- Eu^{3+} 的试纸上, 在365 nm紫外光下观察试纸颜色变化, 通过纸基标准比色卡识别水样中TCs的含量。

5 结果与讨论

5.1 NiNCs- Eu^{3+} 对TCs的荧光响应机理

在NiNCs (50 μL)和 Eu^{3+} (100 μL , $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)混合溶液中加入500 μL 不同浓度的TC和OTC溶液, 用紫外-可见分光光度计和分子荧光光谱仪研究NiNCs- Eu^{3+} 对TCs的荧光响应机理。如图2A、B

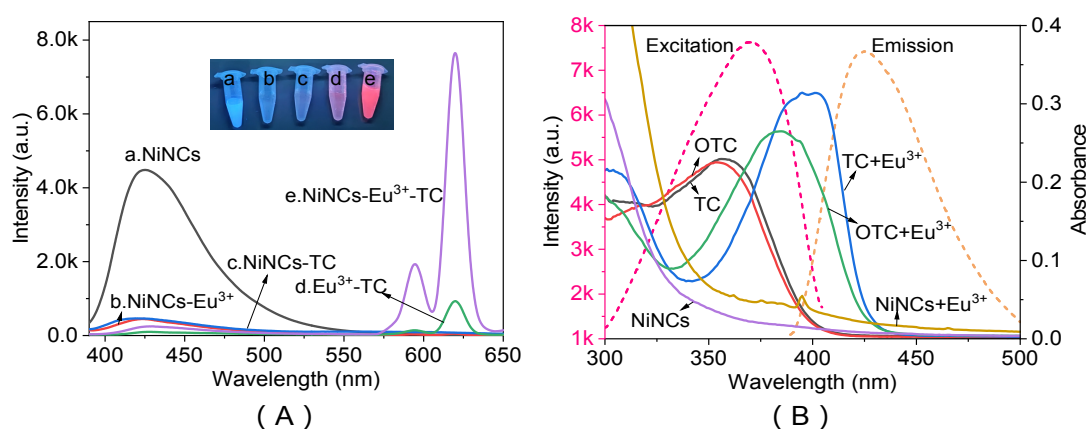


图2 (A) NiNCs (a)、NiNCs- Eu^{3+} (b)、NiNCs-TC (c)、 Eu^{3+} -TC (d)和NiNCs- Eu^{3+} -TC (e)的荧光发射光谱;
(B) NiNCs的激发和发射光谱图, TC、OTC、 Eu^{3+} -TC、 Eu^{3+} -OTC、NiNCs和NiNCs- Eu^{3+} 的紫外吸收光谱

电子版为彩图

可知, NiNCs在365 nm的激发下显示出430 nm处的强蓝色荧光。当加入 Eu^{3+} 溶液后, 由于诱导聚集效应, NiNCs在430 nm处的荧光被淬灭。接着向NiNCs- Eu^{3+} 混合溶液中加入TC, 由于内部过滤效应, 它们在430 nm处的荧光减弱。但在620 nm处出现了明显的 Eu^{3+} 特征红色发射峰^[11], 这是因为TC吸收的能量可以通过“天线效应”有效地转移到 Eu^{3+} , 从而导致与NiNCs- Eu^{3+} 系统相比, Eu^{3+} 发射光强度增强^[12]。从图2A发现NiNCs- Eu^{3+} -TC在620 nm处的荧光强度是 Eu^{3+} -TC的近7倍。说明NiNCs可以通过金属增强荧光效应(MEF)进一步增强 Eu^{3+} -TC的荧光强度。

5.2 比率荧光传感器对不同浓度TCs的识别性能

为研究NiNCs- Eu^{3+} 对TCs的识别性能, 分别将一系列不同浓度的TC和OTC溶液添加到NiNCs- Eu^{3+} 的混合溶液中。如图3A、C所示, 在365 nm的激发下, 随着TC和OTC浓度的增加, 430 nm处的荧光强度逐渐减少, 而620 nm处的荧光强度逐渐增大。如图3B、D所示, $I_{620\text{nm}}/I_{430\text{nm}}$ 的值随着TC和OTC浓度(0.10–50.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的增加呈线性递增, 相关系数(R^2)分别为0.9937和0.9984, 满足分析方法学要求。根据检出限计算公式 $\text{LOD} = 3\sigma/S$, 算得该方法对TC和OTC的LOD分别为27 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和19 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明该比率荧光传感器可用于TC和OTC的定量分析。

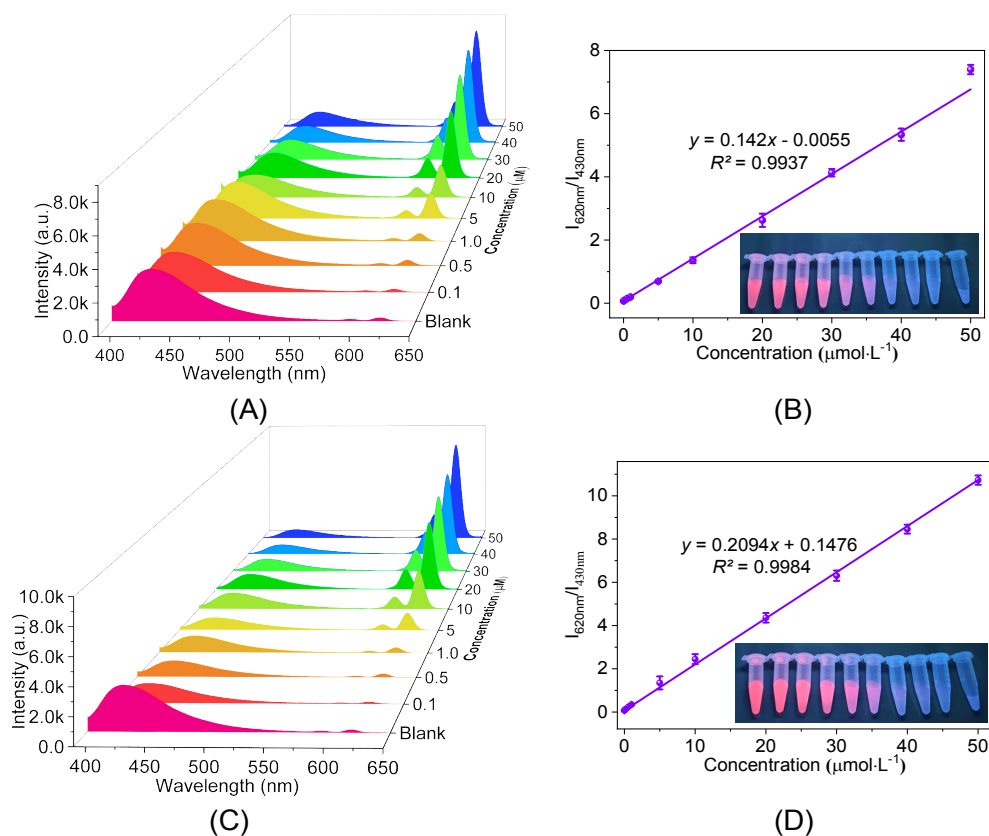


图3 NiNCs- Eu^{3+} 对不同浓度(0.00、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00、30.00、40.00和50.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的TC (A)和OTC (C)溶液的荧光响应以及 $I_{620\text{ nm}}/I_{430\text{ nm}}$ 与TC (B)和OTC (D)浓度(0.00–50.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)之间的线性关系

5.3 荧光传感器的选择性

为了进一步探究所构建的荧光传感器对TC和OTC的选择性, 选择了离子(如 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 Cl^{-} 、 SO_4^{2-})和天然氨基酸(如GSH、L-Glu、L-His、D-Try)作为干扰物进行选择考察。如图4A所示, NiNCs- Eu^{3+} 对TC和OTC的响应值($I_{620\text{ nm}}/I_{430\text{ nm}}$ 分别为7.4和10.7)远大于其他干扰物; 且从图4B看, 在干扰物存在下, NiNCs- Eu^{3+} 对TC和OTC的响应值基本无影响。结果表明构建的比率荧光传感器对TCs具有良好的选择性。

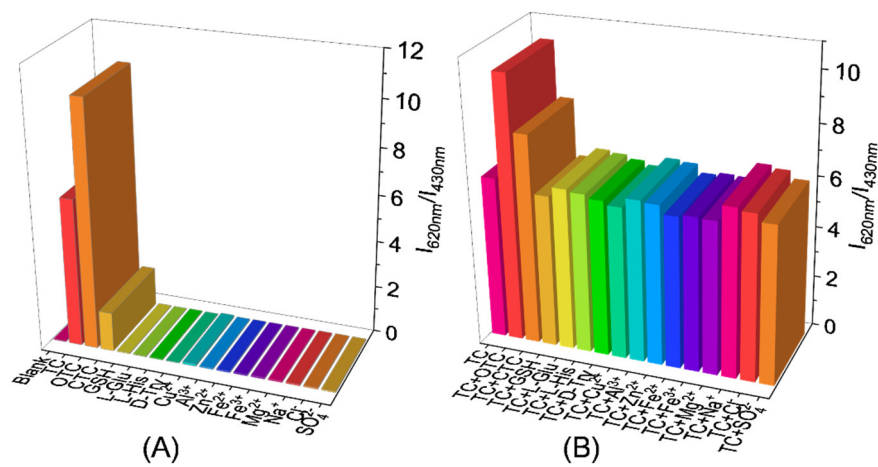


图4 (A) NiNCs-Eu³⁺与各种干扰物的 $I_{620\text{ nm}}/I_{430\text{ nm}}$ 值; (B) 在干扰物存在下, NiNCs-Eu³⁺与TC的 $I_{620\text{ nm}}/I_{430\text{ nm}}$ 值
电子版为彩图

5.4 样品加标回收率

分别在自来水和湖水中加入三个不同浓度的TC和OTC (5.00、10.00、20.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 采用比率荧光传感器进行样品加标回收实验。结果如表1所示, 该方法在自来水和湖水的样品加标回收率分别90.20%–95.55%和89.10%–97.60%。

表1 自来水和湖水中TC和OTC的测定($n = 3$)

种类	原始浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	添加浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	自来水			湖水		
			检测浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%	检测浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
TC	0	5.00	4.59	91.80	3.20	4.47	89.40	1.79
		10.00	9.02	90.20	3.22	8.91	89.10	2.34
		20.00	19.11	95.55	2.08	18.18	90.90	3.83
OTC	0	5.00	4.71	94.20	3.32	4.62	92.40	1.72
		10.00	9.25	92.50	4.06	9.25	92.50	3.68
		20.00	18.24	95.20	1.90	19.52	97.60	3.22

为进一步验证所制备比率荧光传感器的性能, 选用浸有NiNCs-Eu³⁺的试纸制作纸基传感器检测自来水和湖水中TC和OTC。向浸泡了NiNCs-Eu³⁺的试纸上分别加入0.00–50.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TC和OTC, 制作纸基荧光传感器标准比色卡。如图5A所示, 随着TC和OTC浓度增加, 纸基比色卡的颜色逐渐从亮蓝色变为红色, 颜色递变肉眼可辨识。为了进一步验证纸基荧光传感器在实际样品TCs检测中的应用, 实验将浸泡有NiNCs-Eu³⁺的试纸用于检测自来水和湖水中的TC和OTC, 并通过加标回收实验验证方法的准确性。从图5B可以看出, 加标水样的试纸颜色与标准比色卡相接近, 表明可通过纸基荧光传感器可视化识别环境样品中TCs。

6 思考题

- (1) 使用NiNCs作为荧光传感器有哪些优势?
- (2) 比率荧光传感器的优点?
- (3) 什么是“天线效应”和“内部过滤效应”?
- (4) 纸基荧光传感器用于荧光分析检测有哪些优点?

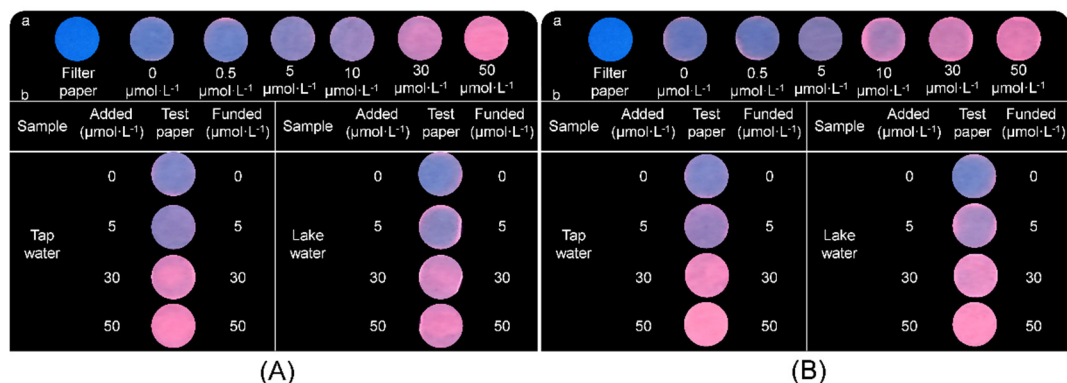


图5 (A) 纸基荧光传感器可视化识别TC: 标准比色卡(a)和识别自来水和湖水中的TC (b);
(B) 纸基荧光传感器识别OTC: 标准比色卡(a)和识别自来水和湖水中的OTC (b)

电子版为彩图

7 教学组织形式和实施成效

(1) 实验学时安排和教学组织形式。

实验建议安排8学时,分为两个阶段进行:第一阶段为基于NiNCs-Eu³⁺的比率荧光传感器检测四环素和土霉素方法的建立和荧光机理的探索,以及选择性和加标回收实验;第二阶段为基于NiNCs-Eu³⁺的纸基荧光传感器的制备和应用。两个阶段共需约24 h (20 h + 4 h)。每组实验参与实验的学生人数为10–15人,每4个人1小组协作开展实验。

(2) 实验教学可采用“线上线下”混合教学模式。

课前,学生通过综合化学实验教学平台线上预习,自主观看实验原理讲授视频、PPT、相关文献等学习资料,了解实验的原理、步骤和注意事项,同时熟悉紫外-可见分光光度计和分子荧光光谱仪的原理、结构和操作,完成预习报告。

线下课堂,教师可针对学生的预习情况进行总结,强调实验注意事项,引导学生探究实验条件对实验结果的影响,如:

- ① NiNCs的含量对NiNCs-Eu³⁺的荧光性能的影响;
- ② 反应时间、温度、酸度等因素对NiNCs-Eu³⁺荧光传感器响应性能的影响。

学生分组完成实验后,引导学生学会数据处理、图表绘制,根据实验数据撰写科技论文。有条件的可要求学生根据实验结果进行小组汇报。通过该项目可锻炼学生化学专业综合技能,培养学生查阅文献、实验技能、图表绘制和科技论文撰写的能力。

(3) 项目实施成效。

我校化学专业综合化学实验基于科研创新平台开展实验教学,每年基于教师科研成果选取10个实验项目作为备选项目,学生根据自己的兴趣选做其中4个实验项目。该项目纳入我校化学专业综合化学实验教学内容,并组织实施两年。从近两年选课的学生人数看,较多学生选择该实验,并取得良好的教学效果。大部分学生认为该实验过程操作简便,能够综合锻炼化学实验技能,培养理论联系实际的能力,同时实验数据处理能力、图表绘制能力也得到大大提升;另外,从这个可视化识别的实验中深刻理解了化学发光的原理和荧光传感器的知识,激发了自己对化学实验及科学研究的兴趣。2022年,学生用该实验项目组队参加广东省大学生生物化学实验技能大赛获得了一等奖。

8 结语

本实验项目提出基于镍纳米团簇-钕混合构建纸基比率荧光传感器可视化识别环境水体中四环素和土霉素的新方法。该实验项目操作简单、实验现象明显,能综合训练化学专业本科学生的专业

技能,适合作为综合化学实验教学内容。该实验不仅让学生理解荧光发光机理,还引入了天线效应和内部过滤效应,让学生通过查阅文献拓展学习课外知识。同时,本项目提出比率荧光传感器的方法可让学生理解比率荧光传感器相比于单信号荧光强度检测的优点,让学生懂得如何减少实验误差,提高解决实际问题的能力。该实验项目仅需使用紫外-可见分光光度计和分子荧光光谱仪等基础性仪器分析设备,实验条件容易实现。总之,该实验项目具有灵活性、创新性和可视化等优势,不仅可以激发学生的研究兴趣,也有利于学生综合能力的培养。

参 考 文 献

- [1] Li, D.; Chen, Z.; Mei, X. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *250*, 25.
- [2] Sun, H.; Zhang, J. B.; Wang, M. J.; Su, X. G. *Microchem. J.* **2022**, *179*, 107574.
- [3] 董江雪, 范亚杰, 刘晓彤, 李慧. *大学化学*, **2022**, *37* (6), 2107031.
- [4] Jia, L.; Xu, Z. T.; Zhang, L. N.; Li, Y. X.; Zhao, T. Q.; Xua, J. *Appl. Surf. Sci.* **2022**, *592*, 153170.
- [5] Yao, R. H.; Li, Z. J.; Liu, G.; Fan, C. B.; Pu, S. Z. *Talanta* **2021**, *234*, 122612.
- [6] Sun, X.; Jiang, M.; Chen, L.; Niu, N. *Microchim. Acta* **2021**, *188*, 297.
- [7] Hua, Y.; Qiu, X.; Sonne, C.; Brown, R. J. C.; Kim, K. H. *Chemosphere* **2022**, *303*, 135150.
- [8] 业思晨, 陈琼, 吴琼友, 刘盛华, 尹军, 原弘. *大学化学*, **2022**, *37* (7), 2109111 .
- [9] 陶友荣, 吴兴才. *大学化学*, **2017**, *32* (11), 51.
- [10] 何田, 顾峥烨, 曾雨霏, 胡余宗, 尹守春. *大学化学*, **2017**, *32* (11), 57.
- [11] Zhou, J.; Zhao, R.; Liu, S.; Feng, L.; Li, W.; He, F.; Gai, S.; Yang, P. *Small Methods* **2021**, *5*, 2100812.
- [12] Yan, Y.; Liu, J. H.; Li, R. S.; Li, Y. F.; Huang, C. Z.; Zhen, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1063*, 144.